

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



GUATEMALA, AGOSTO DEL 2009.

**UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**“EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE CALAHUALA
(*Phlebodium pseudoaureum*) SUMINISTRADA EN POLLO DE
ENGORDE”**

TESIS

**PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN
CARLOS DE GUATEMALA**

POR

DAVID ISAAC SIERRA MARTINEZ

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE

MÉDICO VETERINARIO

GUATEMALA, AGOSTO DEL 2009.

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: M. V. LEONIDAS ÀVILA PALMA

SECRETARIO: M. V. MARCO VINICIO GARCÍA URBINA

VOCAL I: M. V. YERY EDGARDO VELIZ PORRAS

VOCAL II: M. V. MSc. FREDY ROLANDO GONZÁLEZ GUERRERO

VOCAL III: M. V. Y Zoot. . MARIO ANTONIO MOTTA GONZÁLEZ

VOCAL IV: Br. SET LEVI SAMAYOA LÓPEZ

VOCAL V: Br. LUIS ALBERTO VILLEDA LANUZA

ASESORES:

M. V. MSc. LUCRECIA EMPERATRIZ MOTTA RODRIGUEZ

M. V. BLANCA JOSEFINA ZELAYA DE ROMILLO

M. V. CARLOS ENRIQUE CAMEY RODAS

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

**EN CUMPLIMIENTO CON LO ESTABLECIDO POR LOS ESTATUTOS DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
PRESENTO A SU CONSIDERACIÓN EL PRESENTE TRABAJO DE
GRADUACIÓN TITULADO**

**“EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE CALAHUALA
(*Phlebodium pseudoaureum*) SUMINISTRADA EN POLLO DE
ENGORDE”**

**QUE FUERA APROBADO POR LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

PREVIO A OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO:

A Dios Todopoderoso, mi Creador, mi Rey, mi Señor, mi Salvador y mi Sustentador.

A mis queridos padres: Lic. Guillermo David Sierra Quiroa y Rosa Elvira Martínez Landaverde de Sierra.

A mis hermanas: Flor de María y Georgina Mayarí.

A mi sobrinito: Pablo Andrés L. Sierra.

A mis Abuelitos Paternos: Rodolfo Sierra Pereira y Marta Quiroa Dubòn de Sierra.

A mis Abuelitos Maternos: Benjamin Martínez Jiménez (†) y Juana Landaverde Chinchilla de Martínez (†).

A mi Patria Guatemala.

A mi Querida Casa de Estudios Superiores Universidad de San Carlos de Guatemala.

A mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, especialmente

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su infinito amor, sabiduría, por darme el don de la vida, por llenarme de bendiciones en todos los momentos de mi vida y haberme brindado la oportunidad de culminar con éxito mis estudios.

A mis padres, por todo su amor, apoyo y consejos que me han brindado a lo largo de mi vida. Porque han hecho de mi una persona de bien, porque sin su ayuda no hubiese realizado el mayor sueño de mi vida. Los Amo.

A mis hermanas por su cariño y apoyo incondicional, porque son parte importante en mi vida.

A mi sobrinito, Pablo Andrés L. Sierra, por llenar mi vida de alegría.

A mis abuelitos, por sus sabios consejos, apoyo moral y sus bendiciones.

A mis amigos Marisol González, Vivian López, Marisol Marroquín, Maritza Yaquian, Juan José Chávez, Raúl Díaz, Leonidas Gómez, Johana Herrarte, Irene Castillo, Emilio Paniagua, Manuel Cobar, Glenda De León, por haber compartido conmigo tantas vivencias buenas y malas, momentos inolvidables y por brindarme su amistad y apoyo.

A todos mis compañeros, y personas que en algún momento formaron parte de mi vida académica.

A mis asesores, Dra. Lucrecia Motta, Dra. Blanca de Romillo, Dr. Carlos Camey, por su apoyo y dedicación en la realización del estudio.

A mis catedráticos, por haberme brindado los conocimientos que ahora hacen el profesional que soy.

A mis Padrinos Lic. Carlos Sierra Romero, Dr. Jorge González García, Lic. Guillermo Sierra Quiroa, por compartir sus conocimientos y por haberme brindado su confianza.

Al Dr. José Cupertino Arias y Familia, por brindarme su confianza, su amistad y su asesoramiento clínico.

A la Dra. Beatriz Santizo y Dr. Francisco Escobar por su valiosa colaboración en la realización del estudio.

A la Dra. Elsa Roque, por brindarme su amistad y por compartir sus conocimientos médicos.

A la Dra. Dora Elena Chang, por todas sus enseñanzas, y haberme brindado la confianza y la oportunidad de poder realizar este estudio dentro del área de la Etnoveterinaria

A la Dra. Karen Calderón del Centro de Etnoveterinaria y Terapias Alternativas (CIETA) por su apoyo, en la realización del estudio.

A la Dra. Jeannett Urdiales por la confianza depositada en mí, y por ser uno de los pilares en la realización de este estudio de investigación.

A Veterinarios Sin Fronteras de España, por el apoyo económico en la realización del estudio.

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LINPRONAT, por abrirme las puertas y realizar parte importante de mi estudio.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, especialmente a la Escuela de Medicina Veterinaria, mi *alma mater*, Templo forjador de mi profesión.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	2
III. OBJETIVOS	
3.1 General	3
3.2 Específicos	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	
4.1 Denominación, nombre científico, sinónimos	4
4.2 Descripción botánica	4
4.3 Datos Agrotecnológicos	5
4.4 Uso tradicional	5
4.5 Inmunidad	6
4.6 Constitución del Sistema Inmune	6
4.7 Inmunidad Humoral	7
4.8 Inmunidad Celular	8
4.9 Titilación de Anticuerpos	9
4.10 Vacuna Liofilizada para NewCastle	9
4.11 Forma farmacéutica	10
4.12 Propiedades Inmunológicas	10
4.13 Posología y modo de administración	10

V. MATERIALES Y MÉTODOS		
5.1	Recurso humano	11
5.2	Recursos biológicos	11
5.3	Lugar experimental	11
5.4	Materiales	11
5.5	Método experimental	12
5.5.1	Área de estudio	12
5.5.2	Diseño experimental	12
5.6	Método de campo	12
5.6.1	Tratamientos	12
5.6.1.1	Grupo tintura	13
5.6.1.2	Grupo polvo	13
5.6.1.3	Grupo control	13
5.6.2	Obtención de la tintura	13
5.6.3	Obtención del polvo	14
5.6.4	Manejo de los animales	14
5.7	Método diagnóstico	14
5.7.1	Determinación de los títulos de Ac post vacunales	14
5.7.2	Obtención de la muestra por medio de papel filtro	15
5.7.3	Metodología de la prueba de H.A. y H.I.	16
5.7.3.1	Prueba de Hemaglutinación (H.A.)	16
5.7.3.2	Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (H.I.)	16
5.8	Método estadístico	17
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		18
VII. CONCLUSIONES		23
VIII. RECOMENDACIONES		24
IX. RESÚMEN		25
X. BIBLIOGRAFÍA		26
XI. ANEXOS		28

I. INTRODUCCIÓN

La producción de pollo de engorde es muy importante para el desarrollo de la avicultura nacional, y es necesario que las aves conserven un buen estado de salud. En Medicina Veterinaria es importante la profilaxis de la parvada, para lo cual es conveniente que cuenten con un sistema inmune competente que sea capaz de controlar y destruir los distintos agentes etiológicos con los que el ave tenga contacto.

Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) es una planta que se ha utilizado desde hace varias décadas para tratar afecciones digestivas, respiratorias, cardíacas, reumáticas, desordenes inmunológicos. Se le atribuye propiedad analgésica, antihemorrágica, depurativa, expectorante, tranquilizante, inmunomoduladora.

Actualmente la medicina natural esta teniendo auge en las producciones pecuarias, ya que se ha enfrentado con problemas sanitarios por la mala utilización de productos químicos.

En este estudio se determinó el efecto de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) sobre la respuesta inmune en pollos de engorde, buscando alternativas dentro de la medicina natural para que los pequeños productores exploten los recursos que tiene nuestro país, en una forma económica y segura para las producciones pecuarias.

II. HIPÓTESIS

No existe efecto de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) sobre la respuesta inmune post vacunal en pollos de engorde, o

No existe efecto en la forma de administración (tintura o en polvo) y dosis administrada de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) sobre la respuesta inmune post vacunal en pollos de engorde.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- ❖ Generar información sobre el efecto inmuno estimulante de Calahuala en Pollos de engorde.

3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Determinar el efecto que Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) causa sobre la respuesta inmune post vacunal en pollos de engorde.
- ❖ Determinar si existe efecto de la forma de presentación (tintura o en polvo) de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*), sobre la respuesta inmune post vacunal en pollos de engorde.
- ❖ Determinar si existe efecto a la dosis administrada de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) sobre la respuesta inmune post vacunal en pollos de engorde.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Denominación, nombre científico, sinónimos

Denominación: Calahuala.

Nombre Científico: *Phebodium pseudoaureum*

Sinónimos: *Phlebodium leucotomos*,
Polypodium leucotomos.

Nombres comunes: Calahuala, calaguala

4.2 Descripción Botánica:

Rizoma de 0.7 a 1.5cm. de ancho, generalmente farinoso, escamas 5-8mm subenteras a moderadamente denticuladas, la farina blanca, las escamas concoloras, generalmente anaranjadas, no clatradas; hojas monomorfas, pinnatisectas, a menudo glaucas en el envés articuladas al rizoma; con ápice atenuado, agudo o acuminado; pinas de 10-33 x 1-3cm., glabras en el envés, los márgenes engrosados y cartilagosos, enteros o casi enteros; nervaduras areoladas, las arbolos con o sin nérvulos incluidos; soros redondeados, sin parafisos, dispuestos en el ápice fusionado de 2 nérvulos incluidos, en 1-7 series entre la costa y el margen; esporas hialinas, $x=37.47$ especies.(4)

Nativas de Centro América. Crecen silvestres en troncos de palma, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Se encuentran desde Florida, México y Centro hasta Sur América en alturas de 1,000-2,600msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepequez y Zacapa.(4)

4.3 Datos Agrotecnológicos:

Hábitos epífita distribuida en un rango de altura de 4-12m sobre el dosel de los árboles y estar acompañada de otras especies vegetales. Se caracteriza por un clima templado, época lluviosa no bien definida, alta nubosidad que favorece a la precipitación horizontal a partir de 800 hasta los 1,200msnm, estableciéndose las condiciones típicas de un bosque nuboso donde la precipitación horizontal es mas frecuente en época seca, esta condición se da en posición noreste a las montañas. Humedad relativa menor al 80%.(4)

4.4 Uso tradicional

La infusión y decocción del rizoma se usa oralmente para tratar afecciones digestivas: enteritis crónica por sensibilización a la leche de vaca. Afecciones respiratorias: broncoespasmos de origen alérgico. Afecciones cardíacas: hipertensión, purificar la sangre. Afecciones neuromusculares: reumatismo, gota, osteoartritis, fracturas. Enfermedades venéreas: sífilis. Afecciones renales. Afecciones Dermatológicas: psoriasis, eczemas atópicos, vitiligo. Se le atribuye propiedades inmunomoduladoras, desinflamantes, antihemorrágicas, diuréticas, espasmolítica, tranquilizante, anti tumorales.(1, 4, 11)

La acción de los Factores del Complemento se traduce en los siguientes hechos in Vitro: inhibición de las síntesis de factor activador de plaquetas (PAF), la excitación de neutrófilos inducida por PAF; inhibición de la síntesis de leucotrieno B4 (LTB4); inhibición de la proliferación esplenicitaria murina a Con A (Convacalina); inhibición de la proliferación de linfocitos humanos a Fitohemaglutinina (PHA).(2)

Estudios de toxicidad realizados en Calahuala con ratones y ratas no han demostrado ninguna toxicidad a dosis aguda o crónica; en humanos, dosis orales mayores a 1000mg no ha mostrado toxicidad.(1)

La dosis terapéutica en humanos es de 1-4g/taza en decocción, 3-5ml de tintura 1:10 en etanol 35% (3)

Valores de toxicidad aguda: CL50 (mg/mL) = 409,24.
DL50 en ratones (mg/kg) = 16369,6.(1)

4.5 Inmunidad:

El sistema inmune, es un mecanismo de defensa altamente especializado, su propósito es el de proteger ave de la muerte, después que éste ha sido infectado por bacterias oportunistas patogénicas, virus, hongos, protozoarios y ciertas toxinas.

Los agentes patógenos son antigénicos. Un ANTÍGENO, es aquel que causa una respuesta inmune. Los tipos de antígenos incluyen proteínas, lipoproteínas (grasas), nucleoproteínas (DNA, RNA), o polisacáridos (carbohidratos). El propósito básico de un antígeno es la habilidad que tiene de inducir inmunopatogenicidad y de reaccionar con productos del sistema inmune.

La inmunopatogenicidad no es propiedad inherente del antígeno en sí, pero es dependiente para reconocer la existencia de agentes extraños en el ave por el sistema inmune. Como ejemplo, un virus invade o infecta al ave, para luego el sistema inmune reconocerlo como extraño, induce una respuesta y lo destruye.(8)

4.6 Constitución del sistema inmune

Físicamente, está constituido por: El sistema linfoide, éste está compuesto de: sangre, ganglios linfáticos (médula ósea, Bolsa de Fabricio, bazo y el timo) y especialmente los linfocitos.

La función del sistema linfoide es la de concentrar a los antígenos invasores desde todas las partes del cuerpo, hacer que los linfocitos circulen a la sangre y tejidos, de manera que éstos puedan encontrar a esos agentes invasores para destruirlos.

El sistema inmune tiene básicamente tres (03) componentes llamados: INMUNIDAD HUMORAL, INMUNIDAD DE CÉLULAS MEDIADORAS, E INMUNIDAD RETICULOENDOTELIAL. Estos componentes trabajan juntos para responder a los agentes invasores patogénicos.(8)

4.7 Inmunidad Humoral

Las células B están envueltas en la inmunidad humoral y son responsables de la producción de anticuerpos específicos contra muchos antígenos o patógenos.

Los anticuerpos son específicos y sólo reaccionan con el antígeno para el cual ellos se están produciendo.

Los anticuerpos son llamados INMUNOGLOBULINAS (Ig). Existen cinco (05) tipos de anticuerpos: Ig M, Ig G, Ig A, Ig D, Ig E.

El tejido linfóide secundario (proveniente de la Bursa) es responsable de la producción de ANTICUERPOS CIRCULANTES. Hay también nódulos linfoides localizados en el intestino y a nivel del área del ciego que tienen función inmunológica local contra bacterias y otros agentes antigénicos que se encuentran en esa zona (intestino).

Cuando un antígeno extraño invade el sistema de las aves, estimula la producción de anticuerpos y formación de linfocitos que actúan como células memoria. Estos reservan la información necesaria para producir anticuerpos idénticos si la estimulación del mismo antígeno ocurre otra vez. Esto es llamado, RESPUESTA ANAMNÉSICA y ocurre como segunda exposición del antígeno, con producción más rápida de anticuerpos y de gran magnitud. Esto es básico en todas las aves para prevenir enfermedades y en el caso de las reproductoras, para elaborar altos niveles de anticuerpos que serán transferidos a través de la yema a la progenie. Esto dará al pollito (a) de los agentes infecciosos antes de que él pueda desarrollar una respuesta inmune activa. Esto es llamado INMUNIDAD PASIVA O MATERNAL.(8)

De cualquier modo la inmunidad pasiva o maternal comienza a disminuir después que el pollo nace. El total de anticuerpos bajan por mitad cada 03-04 días. Los niveles de anticuerpos caen más rápido a medida que el pollito se acerca a las dos semanas de edad. Al final de la segunda semana los anticuerpos maternos son muy escasos. Durante este período la protección puede variar de un pollo a otro debido a variaciones biológicas de gallina a gallina sobre el total de anticuerpos que pasan a través de la yema.(8)

Los anticuerpos que pueden proteger al huésped pueden medirse en pruebas de neutralización de virus (NV). No obstante que la respuesta de NV parece ser paralela a la respuesta de inhibición de hemoaglutinación (H.I.), esta última a menudo se utiliza para tasar la respuesta protectora, en especial después de la vacunación.(5)

Cuando las aves sobreviven a la infección con el Virus de Newcastle, por lo general, los anticuerpos son detectables en el suero de 6 a 10 días. Las cantidades dependen de la cepa infectante, pero por lo común, la respuesta máxima se da entre las 3 a 4 semanas. La disminución en los títulos de anticuerpos varía con el título obtenido, pero es mucho más lento que cuando se desarrollan. Las concentraciones de anticuerpos en pollos de un día de edad se relacionan de manera directa con los títulos en las reproductoras.(5)

4.8 Inmunidad Celular

Los linfocitos (células B, células T y macrófagos) llevan a cabo la principal función inmune. Los linfocitos inmaduros, son células que se originan en el saco de la yema del embrión, durante la primera semana de incubación. Después ellos migran a dos órganos especiales: Uno de ellos es el TIMO, localizado a lo largo y a ambos lados del cuello del ave, donde maduran como células T o TIMOCITOS, el

otro órgano es la BOLSA DE FABRICIO, localizada en la parte dorsal de la cloaca, donde ellos maduran y se transforman en células B.

Las células T comienzan a salir del timo (también pueden pasar a través de la Bursa) antes del nacimiento del pollo. Esas células acumuladas en los órganos linfoides como el bazo, tonsilas cecales y la glándula harderiana (cerca del ojo) ayudan a las células T en el reconocimiento de los antígenos como agentes extraños y en la activación de las células B. Desde el nacimiento hasta las 6-8 semanas de edad en los pollos, las células B migran fuera de la Bursa a los mismos órganos de las células T.(8)

La respuesta inmunitaria inicial a la infección con Virus de Newcastle es celular y puede ser detectable a los 2 a 3 días después de la infección con cepas vacunales vivas. Tal vez, esto explica la protección temprana contra el desafío que se registra en aves vacunadas antes de tener una respuesta de anticuerpos medibles. (5)

4.9 Titulación de anticuerpos

Un pollo de engorde se considera inmunológicamente protegido con una titulación de anticuerpos Log^2 , titulación 5. ¹

4.10 Vacuna Liofilizada para NewCastle.

Composición cualitativa y cuantitativa. Virus de la Enfermedad de New Castle, cepa VG/GA, como mínimo $5,5\text{log}^{10}$ DIE50. Excipiente: CSP 1 dosis

¹. Motta, LE. 2007. Titulación de anticuerpos en pollos de engorde. Guatemala, GT. Departamento de Ornitopatología, FMVZ/USAC. (Comunicación personal)

4.11 Forma farmacéutica

Liofilizado para diluir en un diluyente apropiado (agua potable no clorada)

4.12 Propiedades Inmunológicas:

La vacuna contiene el virus vivo de la enfermedad de Newcastle, cepa VG/GA. Esta cepa naturalmente apatógena para la gallina. Es una cepa lentogénica con un tropismo predominantemente entérico, además de replicarse también en el tracto respiratorio. La vacunación induce una inmunización activa contra la enfermedad de Newcastle, demostrada por desafío con cepas virulentas.(6,10)

4.13 Posología y modo de administración:

Primo vacunación por vía ocular o por vía óculo-nasal (utilizando un pulverizador) a partir del primer día de edad.(10)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recurso Humano

- ❖ Estudiante investigador
- ❖ Asesores de Tesis

5.2 Recursos Biológicos

- ❖ 300 pollos de engorde de 1 día de edad de la línea Hubbard
- ❖ Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*)
- ❖ Vacuna de Enfermedad de Newcastle Cepa VG/GA
- ❖ Antígeno de Newcastle preparado con 4 dosis hemoaglutinantes (4 DHA) para H. I.
- ❖ Sueros problema
- ❖ Glóbulos rojos lavados, al 1%

5.3 Lugar Experimental

- ❖ Granja Experimental de la F. M. V. Z
- ❖ Laboratorio de Ornitopatología y Avicultura

5.4 Materiales

- ❖ Agujas
- ❖ Agujas tuberculina
- ❖ Alimento
- ❖ Balanza de Reloj
- ❖ Bebederos de Pomo
- ❖ Cal
- ❖ Cascarilla de arroz
- ❖ Comederos
- ❖ Cortinas
- ❖ Costales

- ❖ Costales
- ❖ Desinfectante (amonio cuaternario)
- ❖ Focos infrarrojos
- ❖ Formatos de toma de datos.
- ❖ Galpón
- ❖ Marcadores
- ❖ Microdiluidores con capacidad de 25 μ l.
- ❖ Micropipetas de 25 μ l.
- ❖ Papel filtro Whatman No. 1
- ❖ Placa de poliestireno con fondo en “V” para H. I.
- ❖ Placas de poliestireno con fondo plano
- ❖ Sobres antiestrés

5.5 Método Experimental

5.5.1 Área de estudio

El estudio se realizó en las instalaciones de la Granja Experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicada en la zona 12 de la ciudad de Guatemala, Departamento de Guatemala.

5.5.2 Diseño Experimental

El estudio tuvo una duración de 36 días, dentro del cual se trabajó con 300 pollos de engorde de 1 día de edad de ambos sexos.

5.6 Método de Campo

5.6.1 Tratamientos

Se trabajó con 5 grupos experimentales, compuesto cada uno por sesenta pollitos.

5.6.1.1 Grupo Tintura

Administré tintura de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) desde el séptimo día de edad, inmediatamente después de la vacunación contra la enfermedad de Newcastle hasta la culminación del estudio a los 36 días de edad. Se administró tintura en el agua de bebida en las siguientes dosis:

- ❖ Grupo T 1 dosis 7.5ml/lt.
- ❖ Grupo T 2 dosis 30ml/lt

La dosis administradas se calcularon en base a la posología humana citada por Cáceres, 1999

Se utilizó un total de 6.85lts de tintura de Calahuala 1:5.

5.6.1.2 Grupo Polvo

Administré polvo de Calahuala *Phlebodium pseudoaureum* desde el séptimo día de edad, inmediatamente después de la vacunación contra la enfermedad de Newcastle hasta la culminación del estudio a los 36 días de edad. Se administró el polvo adicionándolo al alimento en las siguientes dosis:

- ❖ Grupo P 1 dosis 1.2 g/kg de alimento
- ❖ Grupo P 2 dosis 4.8 g/kg de alimento

La dosis administradas se calcularon en base a la posología humana citada por Cáceres, 1999

Se utilizó un total del 657.72 g de polvo de Calahuala.

5.6.1.3 Grupo Control

El tercer grupo fue el grupo control, el cual no recibió ningún tratamiento, únicamente el manejo general el cual fue homogéneo para todos los grupos.

5.6.2 Obtención del la tintura

Se llevó a cabo esta metodología en el Departamento de LIPRONAT de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Previo a completar esta parte de la

metodología, se recibió orientación y capacitación sobre los procedimientos respectivos.

Las muestras se obtuvieron a partir de su lugar de crecimiento silvestre (*Phlebodium pseudoaureum*) en los campos de cultivo ubicados en los siguientes lugares:

❖ Km.33 Carretera a Mataquescuintla, Jalapa.

El material vegetal se secó, luego se colocó en el percolador, para realizar extracciones etanólicas por percolación siguiendo los criterios descritos por Mitcher 1978. (7)

5.6.3 Obtención del polvo

Se secó el material vegetal y posteriormente realizó la molienda del mismo.

5.6.4 Manejo de los animales

Se utilizó la guía de alimentación y manejo del pollo de engorde de la línea de Ross. Se vacunó contra la enfermedad de Newcastle con la cepa VG/GA, vía ocular, al séptimo día de edad, y posteriormente a los 21 días de edad.

5.7 Método de Diagnóstico

5.7.1 Determinación de los títulos de anticuerpos post vacunales

Se tomaron muestras de sangre por punción alar (vena radial) con papel filtro, al 10% de los individuos, pertenecientes a los cinco grupos experimentales en el séptimo día de edad, con el objetivo de determinar los títulos de anticuerpos maternos contra la enfermedad de Newcastle. Para ello se utilizó la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (H. I.) siguiendo la metodología descrita por la OIE, 2004. (9)

Se tomaron muestras de sangre por punción alar (vena radial) con papel filtro, al 10% de los individuos, pertenecientes a los cinco grupos experimentales, a los quince días posteriores a la vacunación (21 días de edad de las aves) para determinar títulos de anticuerpos post vacunales contra la enfermedad de Newcastle correspondientes a la primera vacunación.

Luego se tomaron muestras de sangre al 10% de los individuos a los treinta y seis días de edad, para la medición de anticuerpos correspondientes a la segunda vacunación. Se utilizó la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (H. I.) siguiendo los criterios descritos por la OIE, 2004.(9)

Se reportaron como inmunológicamente protegidos, los individuos que se encontraron en un rango de titulación Log_2 título 5. Los títulos menores a Log_2 título 5 fueron considerados como no protegidos.

Para la comparación de datos porcentuales se utilizó la prueba de Chi cuadrado en los tres muestreos con los resultados de la prueba de Inhibición de Hemaglutinación.

5.7.2 Obtención de la muestra por medio de papel filtro

Se presionó la vena radial y se tomó una o dos gotas de sangre con el papel filtro. Se procedió a secar el papel con la muestra a temperatura ambiente sin someterlo a exposición solar.

Papel filtro: En el laboratorio se cortó con una tijera, 2mm. del papel impregnado con la sangre y se colocó en una placa tipo fondo plano con 100 μ l de PBS de pH 7.0, luego se colocó en un mezclador eléctrico por 30 minutos, el resultado fue la muestra con la que se trabajaron las pruebas de diagnóstico.

5.7.3 Metodología de la prueba de Hemaglutinación (H. A.) e Inhibición de Hemaglutinación (H. I.)

5.7.3.1 Prueba de Hemaglutinación (H. A.)

- i. Se coloca 0.025ml de PBS en cada pocito de la placa de poliestireno con fondo en V.
- ii. Se coloca 0.025ml de la suspensión del virus en el primer pocito de la placa, para determinar con exactitud el contenido de la hemaglutinación.
- iii. Se realizan diluciones dobles de 0.025ml de volumen de la suspensión de virus.
- iv. Se coloca 0.025 de glóbulos rojos lavados al 1%.
- v. Se mezcla la solución golpeando suavemente la placa. Se deja reposar los glóbulos rojos por 40 minutos a temperatura ambiente.
- vi. La prueba de H. A. está determinada por la inclinación de la placa y observando la presencia o ausencia de desgarro de los glóbulos rojos, en forma de botón. La valoración debe leerse a la mayor dilución de H. A. completa. Lo que representa 1 unidad de H. A. y se puede calcular con exactitud a partir de la primera serie de diluciones.

5.7.3.2 Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (H. I.)

- i. Se coloca 0.025ml de PBS en cada pocito de la placa de poliestireno con fondo en V.
- ii. Se coloca 0.025ml de suero en el primer pocito de la placa.
- iii. Se realizan diluciones dobles de 0.025ml de suero.
- iv. Se realizan 0.025ml de antígeno de Newcastle preparado con 4 dosis hemaglutinantes para H. I., añadiéndose a cada pocito, se deja la placa por 30 minutos a temperatura ambiente.
- v. Se añade 0.025ml de glóbulos rojos lavados al 1% a cada pocito durante 40 minutos a temperatura ambiente observando la presencia o ausencia de desgarro de los glóbulos rojos, en forma de botón.

- vi. La Cadena título será la mayor dilución del suero que causa la inhibición completa de 4 unidades de hemaglutinación de antígeno. La aglutinación es evaluado por la inclinación de las placas. Sólo los pozos en la que el flujo de glóbulos rojos es la misma tasa que el control de los pozos (que contenga 0,025ml de glóbulos rojos y 0,05ml de PBS) debe considerarse para demostrar la inhibición.

5.8 Método estadístico

El método estadístico utilizado fue la Prueba de Chi cuadrado, para determinar si existió diferencia entre los cinco grupos en cuanto a porcentajes de individuos protegidos y no protegidos.

Se usará la siguiente fórmula:

$$X^2 = \sum n \frac{(\text{resultados observados} - \text{resultados esperados})^2}{\text{Resultados esperados}}$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la realización del presente trabajo de investigación se evaluaron 300 pollos de engorde, de ambos sexos, administrándoles Calahuala en polvo y tintura, que fueron divididos en 5 Grupos: Grupo Control, Grupo Polvo uno(P1) (1.2g/kg alimento), Grupo Polvo dos(P2) (4.8g/kg alimento), Grupo Tintura uno(T1) (7.5ml/lt), Grupo Tintura dos(T2) (30ml/lt)

PRIMER MUESTREO:

En este muestreo no se aplicó ningún tratamiento a los cinco grupos y los títulos de anticuerpos se encontraron dentro de los rangos normales para esta edad.

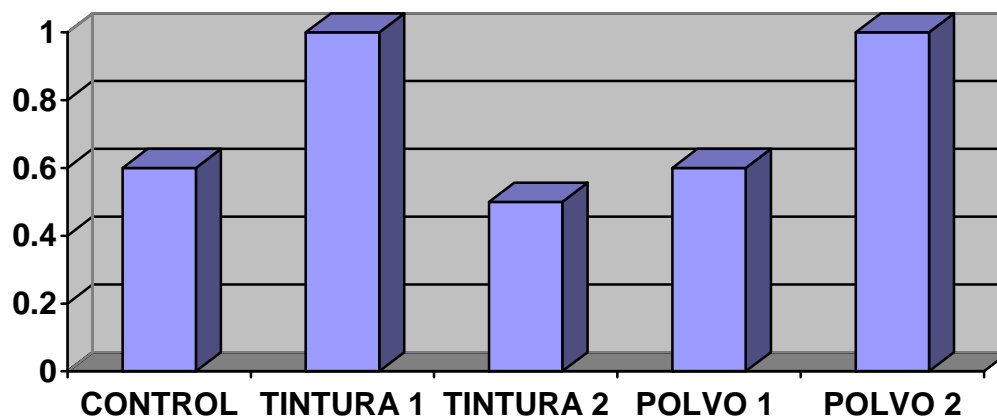
Estadísticamente podemos ver que no hay diferencia significativa, ya que los títulos de anticuerpos tuvieron rangos similares (Log_2 0–3) comportándose de una forma normal para la edad de las aves, debido a que anticuerpos maternos descienden en los primeros siete días de edad.

CUADRO NO. 1

Promedios correspondientes a la medición de anticuerpos maternos, expresados en Log_2 . tomados al 7mo. día de edad, sin tratamiento.

CONTROL	T1	T2	P1	P2
0	0	1	0	2
0	2	0	1	2
3	1	0	0	0
0	1	0	1	0
0	1	1	1	1
1	1	1	1	1
X= 0.6	1	0.5	0.6	1

Promedios de Anticuerpos maternos



SEGUNDO MUESTREO:

Se tomaron muestras a los 21 días de edad para la medición de anticuerpos correspondientes a la primera vacunación, que se realizó a los 7 días de edad.

En base a los datos obtenidos según las pruebas de H. I. correspondientes a la primera vacunación, el grupo Polvo Dos fue el único que tuvo la titulación de anticuerpos mayores a los esperados según la protección vacunal (Log_2 título 5). Probablemente este efecto se debe a que la planta administrada en polvo, en dosis altas eleva los anticuerpos en tiempo menor.

En el resto de los grupos experimentales como en el grupo control, tuvieron titulaciones por debajo de la protección vacunal, debido a que las dosis bajas tardan más tiempo en elevar los anticuerpos, y la tintura en dosis alta se evidencia un rechazo de los pollos probablemente por su alta concentración etanólica.

Estadísticamente existe una diferencia altamente significativa, ya que el grupo polvo dos (P2) mostró en comparación con los otros grupos, mayor cantidad de individuos protegidos, aunque de estos títulos no todos fueron mayores a los esperados por la vacuna.

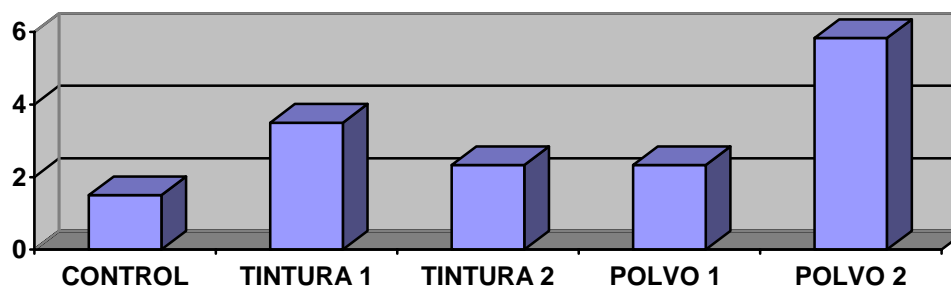
En el cuadro No. 4 de promedios de títulos de los 3 muestreos se observa claramente que hay aumento significativo entre el grupo control y los otros grupos con tratamiento con Calahuala, lo que indica que el producto natural estimuló inmunológicamente a las aves.

CUADRO No. 2

Promedio de la medición de anticuerpos a los 21 días de edad correspondientes a la primera vacunación, (7 días de edad) expresados en Log_2 .

CONTROL	T1	T2	P1	P2
5	5	3	2	1
0	5	3	3	1
0	4	2	3	5
4	4	3	2	6
0	0	1	2	5
0	3	2	2	5
X= 1.5	3.5	2.33	2.33	5.83

Promedio de Anticuerpos correspondientes a la primera vacunación



TERCER MUESTREO:

A pesar de que no existe una diferencia significativa, todos los grupos experimentales tuvieron títulos mayores a los de protección vacunal, sin embargo el grupo Polvo uno fue el que demostró la mayor titulación y uniformidad en los mismos, no así en los otros grupos que fueron menos uniformes y con las titulaciones en rangos protectores.

Al analizar los promedios de los 5 grupos en este muestreo, se puede observar que el promedio mas alto es de Log_2 6.33 (Grupo polvo 1) y promedio mas bajo es de Log_2 5.83 (Grupo control) existiendo diferencia de Log_2 0.5 (lo que no es significativo) entre grupos con tratamiento y el grupo control.

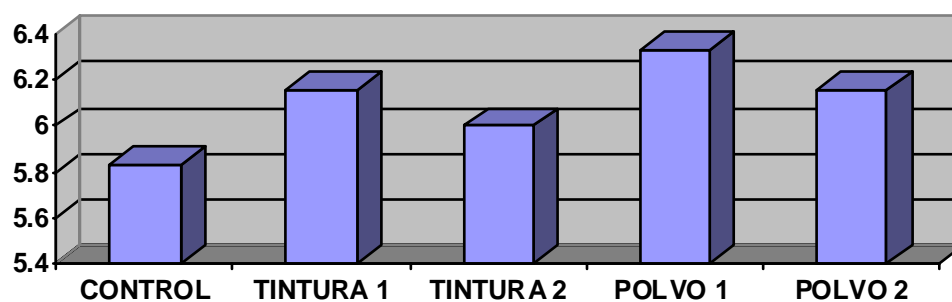
De acuerdo a los resultados obtenidos podemos observar que no hay diferencia significativa en suministrar polvo o tintura, ya que los resultados obtenidos en todos los grupos fueron similares al del grupo control cuando vemos los resultados de los títulos de anticuerpos individualmente.

CUADRO No. 3

Promedio de la medición de anticuerpos correspondientes a la segunda vacunación, expresados en Log_2 , a los 36 días de edad.

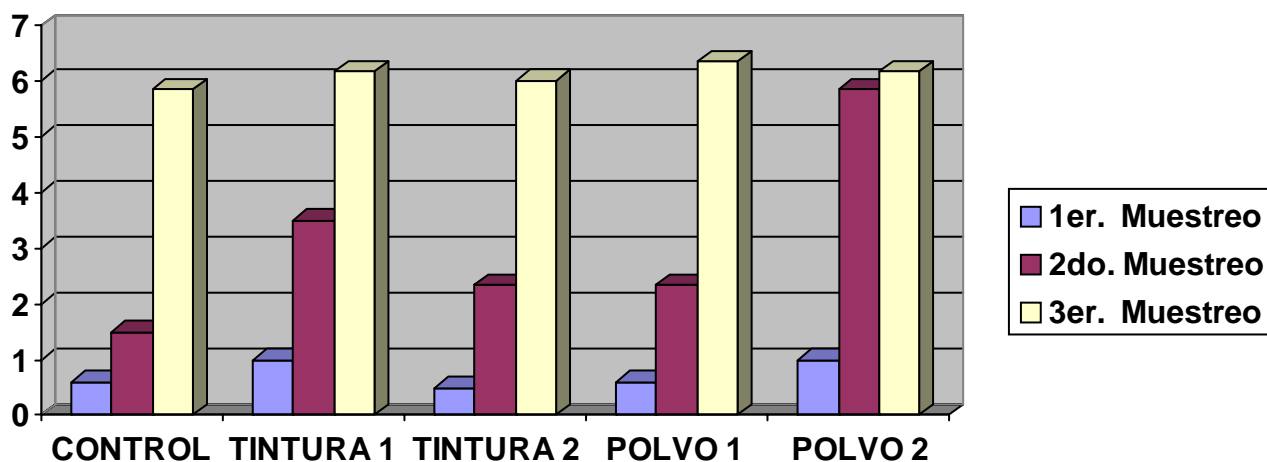
CONTROL	T1	T2	P1	P2
7	6	6	6	7
6	6	6	6	7
6	7	6	6	6
6	6	7	7	6
5	6	5	7	5
5	6	6	6	6
X= 5.83	6.16	6	6.33	6.16

Promedio de Anticuerpos correspondientes a la segunda vacunación



CUADRO No. 4Promedios de Títulos de los tres muestreos expresados en Log.₂

MUESTREO	CONTROL	TINTURA 1	TINTURA 2	POLVO 1	POLVO 2
1ro.	0.6	1	0.5	0.6	1
2do.	1.5	3.5	2.33	2.33	5.83
3er.	5.83	6.16	6	6.33	6.16

PROMEDIO DE TÍTULOS DE ANTI CUERPOS

Aun cuando en este estudio no se evaluaron aspectos nutricionales, se pudo observar que el grupo polvo dos, fue el que reflejó mayor consumo de alimento, esto se pudo constatar al momento de la venta (al día cuarenta y dos), ya que los pollos de este grupo reportaron ganancia de peso mayor a 0.5 kg en comparación con los otros grupos experimentales.

VII. CONCLUSIONES

1. En el tercer muestreo se determinó que no hay diferencia significativa entre los cinco grupos, y el grupo Polvo uno fue el grupo que demostró mayor titulación en comparación con los 4 grupos experimentales, teniendo individuos con títulos mayores a los esperados por la vacuna, en rangos de Log_2 6-7. presentando una buena protección de anticuerpos, y de una forma más uniforme que el resto de los grupos.
2. A pesar que al grupo Control no se le dio ningún tratamiento, al día treinta y seis este grupo tuvo títulos altos similares a los grupos de los tratamientos.
3. Los grupos Polvo dos y Tintura uno tuvieron buenos títulos protectores, pero individualmente fueron menos desuniformes, (en rangos de Log_2 5-7 y Log_2 6-7 respectivamente) siendo mejor el grupo Polvo uno, en comparación con estos dos grupos.
4. En los grupos Tintura y Grupo Polvo en altas concentraciones no mostraron mayor incremento en los títulos de anticuerpos, teniendo grupos desuniformes.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el uso de Calahuala en la presentación de polvo en diferentes dosis, ya que fue el tratamiento que dio mejor titulación.
2. Evaluar el uso de Calahuala en aspectos nutricionales (ganancia de peso, conversión alimenticia), para determinar en que otros aspectos influye la planta y conocerle otras propiedades.
3. Evaluar esta planta en otras especies, para comprobarle otras propiedades.

IX. RESUMEN

Se evaluaron 300 pollos de engorde, de ambos sexos, divididos en 5 Grupos de sesenta individuos. Se administró tintura y polvo de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) desde el séptimo día de edad después de la vacunación contra la enfermedad de Newcastle hasta la culminación del estudio a los 36 días de edad.

Se administró en el agua de bebida de las aves tintura de Calahuala en las siguientes dosis: Grupo (T1)7.5ml/lt., Grupo(T 2)30ml/lt. Y en el alimento se adicionó polvo de Calahuala en las siguientes dosis: Grupo (P 1)1.2g/kg de alimento, Grupo (P 2)4.8g/kg de alimento, y el Grupo Control no se le administró ningún tratamiento.

Se tomaron muestras sanguíneas al séptimo día por punción alar (vena radial) con papel filtro, al 10% de los individuos de los cinco grupos experimentales para determinar los títulos de anticuerpos maternos, luego a los 21 días de edad para determinar los títulos de anticuerpos correspondientes a la primera vacunación. Y a los treinta y seis días de edad para determinar los títulos de anticuerpos correspondientes a la segunda vacunación.

En el segundo muestreo (21 días de edad) estadísticamente hay una diferencia altamente significativa, ya que el grupo Polvo dos mostró en comparación con los otros grupos, mayor cantidad de individuos protegidos, aunque estos títulos no fueron mayores a los esperados por la protección vacunal.

En el tercer muestreo (36 días de edad) estadísticamente no hay una diferencia significativa, ya que el grupo polvo uno fue el que mostró mayor cantidad de individuos con títulos de anticuerpos mayores a los esperados por la vacuna, siendo títulos de Log_2 6 y 7, mostrando mayor uniformidad en la titulación, no así en los otros que presentaron menor uniformidad y con las titulaciones en rangos protectores. Aunque el grupo Polvo uno resultó mejor de los cuatro tratamientos, el grupo control también tuvo títulos protectores y son parecidos a los títulos del grupo Polvo uno.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Barajas,L; Herreño, N; López, O;Pombo, L; Mejía,A;Salama ,A. 2007. Monografía de Calahuala - *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. Cl, 34 P.
2. Cacabelos, 1993. Aspectos Inmunomoduladores del extracto de *Polypodium leuctomos*. Madrid ES. s.e s.p.
3. Cáceres,A 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1. Edición. p. 402.
4. _____,2006. Propuestas de monografías farmacopeicas de 10 plantas medicinales Centroamericanas. Guatemala, GT 88 p.
5. Calnek. BW. 1995. Enfermedades de las aves. México Manual Moderno. p 619.
6. Merial. 2005. "Avinew" (en línea). Consultado 14 oct. 2007. Disponible en <http://mx.merial.com/avicultores/productos/avinew/avinew.asp>
7. Mitcher, J. 1978. Caracterización de extractos y aromas como fuente para el desarrollo Agroindustrial. Méxicom Mx. Editorial Mesoamericana. p. 262-266
8. Lertzundy J. 2001. "Sistema inmune del pollo" (en línea). Consultado 28 oct. Disponible en www.pcca.com.ve/va/articulos/va37pag08.html.
9. O.I.E (Organización Internacional de Epizootias). 2004. (en línea). Consultado el 14 oct 2007. Disponible en www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.1.15_Enfermedad_de_Newcastle.pdf

10. Vacuna Avinew, sf. Consultado 15 oct. Disponible en www.emea.europa.eu/pdfs/vet/referral/avinew/112901es4.pdf
11. Vanaclocha, B; Cañigüeral ,S. (Eds) 2003. Fitoterapia, Vademécum de Prescripción, 4 edi. Barcelona, ES, Masson,. S.p.


XI. ANEXOS



Pheblodium pseudoaureum



Rizomas de *P. pseudoaureum*. Corte o sección que muestra el color crema de la harina.


Br. David Isaac Sierra Martínez


M. V. MSc. Lucrecia Emperatriz Motta Rodríguez
ASESORA PRINCIPAL


M. V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
ASESORA


M. V. Carlos Enrique Carney Rodas
ASESOR

IMPRIMASE:


M. V. Leonidas Ávila Palma
DECANO

